

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



Eliška Neuwirthová

Mikroevoluční procesy v rodu *Dactylorhiza*

Microevolutionary processes in genus *Dactylorhiza*

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Tomáš Urfus, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Jan Ponert

Praha, 2018

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 10.5. 2016

Podpis

Poděkování

Velice děkuji školiteli Tomáši Urfusovi a konzultantovi Janu Ponertovi za pomoc, ochotu a cenné rady při zpracovávání tématu mé bakalářské práce. Jsem také vděčna své rodině a kruhu přátel za neustálou podporu a pochopení.

Abstrakt

Rešerše se zabývá mikroevolučními mechanismy v rodě *Dactylorhiza* Neck. ex Nevski, které utvářely a dále utvářejí dnešní podobu taxonu. Obsahem je taxonomický úvod, fenotypová charakteristika a příklady působení hybridizačních a polyploidizačních událostí na vybraných druhových agregátech rodu: *D. maculata* a *D. incarnata*, které obsahují diploidní i tetraploidní linie. Hybridizace a polyploidizace (zejména allopolyploidizace) je původem mnoha linií v rodu, které jsou různého stáří a vznikají i recentně. Zejména allopolyploidie jsou ovšem často špatně rozlišitelné jak morfologicky, tak geneticky. Situaci značně komplikují nekonzistentní taxonomická pojetí druhů v tomto rodě.

Klíčová slova: *Dactylorhiza*, orchidacea, hybridizace, polyploidie, *Dactylorhiza incarnata* agregát, *Dactylorhiza maculata* agregát.

Abstract

The thesis deal with Microevolutionary processes in genus *Dactylorhiza* Neck. Ex Nevski which generated and still generates recent form of the taxa. Content Taxonomic introduction, phenotypic characterization and examples of hybridization and polyploidization influence to chosen aggregates of the genus: *D. maculata* and *D. incarnata*, including diploid and tetraploid lineages. Hybridization and polyploidization (particularly allopolyploidization) is the origin of many lineages of different ages and still occurs. In particular, allopolyploids are often poorly distinguishable, both morphologically and genetically. The situation is inconveniently complicated by the inconsistent taxonomic concepts of the species in the genus.

Key words: *Dactylorhiza*, orchidacea, hybridization, polyploidization, *Dactylorhiza incarnata* aggregate, *Dactylorhiza maculata* aggregate.

Obsah

1.	Obsah	
1.	Obecný úvod o rodě <i>Dactylorhiza</i>	1
1.1.	Taxonomický úvod	1
1.2.	Morfologická a anatomická charakteristika rodu.....	4
1.2.1.	Podzemní části.....	4
1.2.2.	Nadzemní vegetativní orgány.....	4
1.2.3.	Generativní orgány	5
1.2.4.	Mykorhiza	6
1.3.	Ekologie a rozšíření	6
1.4.	Ohrožení a ochrana.....	7
1.5.	<i>Dactylorhiza maculata</i> agg.....	7
1.6.	<i>Dactylorhiza incarnata</i> agg.	8
2.	Mikroevoluční mechanismy.....	8
2.1.	Hybridizace.....	8
2.1.1.	Mezidruhová hybridizace	9
2.1.2.	Výskyt hybridizace.....	9
2.1.3.	Mechanismy hybridizace.....	9
2.1.4.	Hybridogenní linie.....	10
2.1.5.	Dopady hybridizace.....	10
2.1.6.	Hybridizace v subtribu Orchidinae.....	10
2.1.7.	Hybridizace v rodě <i>Dactylorhiza</i>	12
2.2.	Polyploidizace	13
2.2.1.	Polyploidizace jako speciální mechanismus.....	14
2.2.2.	Mechanismy polyploidizace.....	14
2.2.3.	autopolyploidizace v rodě <i>Dactylorhiza</i>	15
2.2.4.	Allopolyploidizace v rodě <i>Dactylorhiza</i>	15
2.3.	Progresivní Parciální endoreduplikace	18
5.	Navrhovaná diplomová práce	19
6.	Závěr	20
7.	Použitá literatura	21

1. Obecný úvod o rodě *Dactylorhiza*

Zařazení v systému cévnatých rostlin:

- Oddělení: Krytosemenné (Magnoliophyta)
- Třída: Jednoděložné (Liliopsida)
- Řád: Chřestotvaré (Asparagales)
- Čeleď: Vstavačovitě (Orchidaceae)
- Rod: Prstnatec (*Dactylorhiza*)

Název rodu *Dactylorhiza* Neck. Ax Nevski byl zmíněn roku 1790 N. J. Neckerem a formálně ustanoven roku 1937 S. A. Nevskim a rod byl předmětem zkoumání mnoha autorů již od 18. Století. (Hunt and Summerhayes 1965) Komplikovanost biosystematické koncepce se dosud odráží na souhrnném pojetí souborů blízké příbuzných druhů (mikrospecií) v několika agregátech. (zk.: agg.) (L. V. Averyanov 1990)

1.1. Taxonomický úvod

Coby rod se značnou morfologickou variabilitou komplikovaný častými hybridními událostmi *Dactylorhiza* dosud nemá definitivně určený počet druhů. Podle rešerše Pedersena (Pedersen 1998) počet druhů fluktuuje u jednotlivých autorů od 6 (Sundermann 1980)* do 75 (Averyanov 1990) druhů, kde jsou za druhy uznány morfologicky rozrůzněné allotetraploidní formy. V průběhu času lze sledovat trend nárůstu počtu druhů. Pojetí druhů rodu a jejich odlišení je však velmi důležité, neboť zástupci rodu *Dactylorhiza* jsou v přírodě značně ohroženi a tyto nesrovnalosti v taxonomii ztěžují jejich ochranu. (Pillon et al. 2007)

Mnoho v současnosti známých mezidruhových hybridů zřejmě pochází z více než 2 rodičovských druhů (De Hert et al. 2012) a mnoho jich je binomicky pojmenováno. Skupina vykazuje mezipopulační i vnitropopulační diverzifikaci u mnoha druhů a vysokou míru hybridizace, přičemž mají vzniklé hybridy obecně vysokou plodnost. Vněkterých případech jsou hybridní jedinci v populaci hojnější, než jejich rodičovské druhy. Nastávají případy, kdy se hybridy v různé míře stabilizují a vznikají tak nové poddruhy. (de Soó 1980) Rod *Dactylorhiza* lze rozdělit (Averyanov 1990) na jednotlivé sekce: sect. *Iberanthus* (disponuje stolonem, (Baumann et al. 2009; Averyanov 1990), sect. *Aristatae*, sect. *Sambucinae* (mělce dělené hlízy se srostlými laloky) a druhově nejpočetnější vlastní sect. *Dactylorhiza*.

Ta je dále rozdělena na podsekce: subsect. *Sesquipedales*, subsect. *Latifoliae*, subsect. *Maculatae* a subsect. *Dactylorhiza*. V rámci této sekce dochází k hybridizaci nejhojněji a řada

hybridů nese binomické označení, což je kontroverzní vzhledem k nomenklatorickým pravidlům. (McNeill et al. 2012, Marhould pers. com.) Obsahuje takové druhové agregáty, jako např.: *D. incarnata* agg., *D. maculata* agg., či *D. majalis* agg., kterým zde bude věnována bližší pozornost. Uvnitř sect. *Sambucinae* je hybridizace také poměrně častá. Obsahuje sympatrické druhy a tak dochází běžně i k introgresi. Mezi sekcemi je hybridizace vzácnější a známá pouze mezi sect. *Dactylorhiza* a sect. *Sambucina* (a to právě s výše zmíněnými druhy agregátů *D. incarnata* agg., *D. maculata* agg., či *D. majalis* agg) či mezi sect. *Dactylorhiza* a *Iberanthus*. (Averyanov 1990) Toto taxonomické pojetí je schématicky znázorněno na obrázku (obr.1.). Toto uskupení určitých druhů, poddruhů, nebo variet do agregátů podporuje svými výsledky řada autorů, (Hedrén 2001; Pillon et al. 2007; Bateman and Denholm 2003) ačkoli se často rozcházejí v přístupu k dílčím konceptům agregátů. Druhové zastoupení v agregátu se také kvantitativně liší, podle toho, zda autor označuje určité linie jako druh či nikoli.

Většina autorů neuznává formální označení sekce a subsekce a rod rozděluje obecně na 5 základních skupin označených rovnou jako agregáty (Bateman and Denholm 2003; Pillon et al. 2007; Hedrén 2001; Shipunov et al. 2004; Ståhlberg and Hedrén 2010): (1) *D. sambucina* agregát (dále agg.) je shluk diploidních druhů, kam se řadí *D. sambucina* (s. stricto), *D. romana* či *D. flavescens*. (2) *D. incarnata* agg. (v Averyanovově pojetí subsek. *Dactylorhiza*) obsahuje diploidní druhy jako jsou *D. euxina* či *D. umbrosa*. (3) *D. maculata* agg. sdružuje geneticky heterogenní soubor druhů v čele s autotetraploidním druhem *D. maculata* (s. stricto) a dále například obsahuje diploidní *D. fuchsii*. (4) Do *D. majalis* agg. (v Averyanovově pojetí subsek. *Latifoliae*) jsou řazeny druhy označované (Hedrén 2001) jako allopolyploidní. Výčet uzavírá poslední skupina druhů označovaná jako primitivní: *D. aristata*, *D. iberica* a *D. viridis*. Posledně zmíněný taxon spíše klasifikován jako *Coeloglossum viride*. Tento druh Bateman et al. (2003) řadí stále pod rod *Dactylorhiza*, avšak Devos et al. ho kupříkladu v roce 2006 zařadil na základě výzkumu ribozomální DNA jen jako sesterský celému rodu.

Mnoho evropských prstnaticů náleží do tzv.: *incarnata/maculata* polyploidního komplexu. Tyto skupiny jsou dobře geneticky i morfologicky odlišené, ale spojují je skupiny jejich allopolyploidních kříženců, kteří jsou však morfologicky velmi variabilní. (Hedrén 2001; Averyanov 1990; Bateman and Denholm 2003; Pillon et al. 2007; Shipunov et al. 2004) Na tento komplex se bakalářská práce zaměřuje, neboť mikroevoluční procesy v rodě *Dactylorhiza* nejlépe ilustruje a vzhledem k šíři problematiky není možné obsáhnout vztahy v celém taxonu.

1.2. Morfologická a anatomická charakteristika rodu

Dactylorhiza je vytrvalá terestrická bylina s podzemní hlízou, nevětvenou vzpřímenou lodyhou, listy uspořádanými do spirály a terminálním květenstvím.

1.2.1. Podzemní části

Hlíza souvisí s překonáváním klimaticky nepříznivých období roku. Vznikla zbytněním báze kořene za účelem uložení zásobních látek pro další sezónu. Původnějším typem je pravděpodobně jednoduchá prstovitě (dlanitě) dělená hlíza dnes přítomná u archaičtějších zástupců (druhových agregátů), například *D. fuchsii* agg., *D. incarnata* agg. Tyto rostliny mají 2-3 hlízy, mělce dlanitě členěné na 2-5 laloků podlouhlého, různou měrou protaženého tvaru. (de Soó 1980) Dalším vývojem a specializací vznikla odvozenější forma hlízy válečkovitého či velmi mělce děleného tvaru. Jedná se o útvar srostlý z více kořenů (obsahuje více středních válců), kterým v současnosti disponuje např. *D. sambucina* agg. (Averyanov 1990; Baumann et al. 2009; de Soó 1980) Unikátní modifikace je u *D. iberica*, která má plazivý podzemní stonek tj.: stolon. (Baumann, Künkele, and Lorenz 2009)

1.2.2. Nadzemní vegetativní orgány

Stonky zástupců rodu *Dactylorhiza* v nodech postrádají interkalární meristémy a tak se lodyha nedělí. Obsahují soustředné válce chlorenchymatických buněk proložené válci různou měrou lignifikovaných buněk, které taktéž obklopují cévní svazky. Uprostřed těchto pletiv se během vývoje rostliny nachází parenchym, který v dospívajícím stonku mizí a je nahrazen dutinou. Velikost této dutiny je druhově specifická a slouží jako důležitý determinační znak. Kupříkladu diploidní druhy ($2n=40$, např. *D. incarnata* agg.) mají dutý stonek většího průměru a autotetraploidní druhy ($4n=80$, např.: *D. maculata* agg.) disponují užším stonkem bez dutiny. (Delforge 2006)

Listy jsou formovány interkalárním meristémem na jejich bázi. Ke konci aktivity meristematických buněk meristém obklopí stonek a vytvoří listovou pochvu. Předek prstnatců měl nejspíše oválné listy na rovnoměrně rozmístěných internodiích. Tvar listů se vyvinul v úzký a kopinatý, u některých severských a horských druhů i podélně svinutých či soustředěných do přízemní růžice u druhů z vysokohorských či aridních stanovišť. (Averyanov 1990; Averyanov 1983*)

1.2.3. Generativní orgány

Květy rodu *Dactylorhiza* jsou zygomorfní, se šesti volnými okvětními lístky. Lístky vnějšího i vnitřního kruhu jsou podobné co do tvaru i velikosti, až na pysk, který má modifikovaný tvar. Rozšířený, trojlaločný pysk bývá mírně ohnutý dolů a u báze vybíhá v rovnou, popř. dolů skloněnou ostruhu. (Baumann et al. 2009; Averyanov 1990) Tyčinky jsou redukované, funkční je jen jedna a to mediální z vnějšího kruhu. Ostatní jsou přeměněny na patyčinky (staminodia) umístěná u prašníku. Sloupek je relativně malý a nese trojlaločnatou bliznu umístěnou na bázi prašníku, těsně nad otvorem do ostruhy.

Květy Prstnatců neprodukují žádný nektar. (Darwin 1892) Šálivé květy jsou velmi častou strategií orchidejí. Benefit šálivých květů spočívá v možnosti vytvořit na úkor případné odměny pro opylovače kvalitnější semena a také zvýšení pravděpodobnosti, že bude pyl přenesen na jinou rostlinu. Orchideje se šálivými květy mají zřetelně větší výskyt opylení jiným jedincem. (Jersáková et al. 2006) Opylovači jsou zejména samotářské včely, čmeláci či brouci. (Baumann et al. 2009; Gutowski 1990)

Pylová zrna jsou sdružena do kyjovitých brylek (polinií) pomocí slizových vláken a polysacharidů. Brylky mají různě dlouhé stopečky (caudicles) zakončené lepivým terčíkem (retinaculum), jsou nesrostlé, na dvoudílné burzikule a skryté za chlopnovitou strukturou prašníku, odděleny malým hrbolkem (rostelum). Brylky tak mohou být sejmuty jednotlivě. Lepivé terčíky jsou kryté víčkem (operculum), které odkryje brylky při kontaktu s tělem opylovače a umožní jejich uchycení a přenos brylek. Brylky se uchytí na přední část těla hmyzu a lepivé terčíky a stopečky rychle uschnou a natočí brylku do pozice důležité pro kontakt s bliznou jiného květu. (Averyanov 1990; Tutin et al. 1980; Baumann et al. 2009) Plodem je tobolka, která může obsahovat až 6000 drobných semen o velikosti pouhých stovek mikrometrů, jež snadno cestují vzdušnými proudy. (L. V. Averyanov 1990)

Prstnatce se množí i vegetativně a to růstem dvou a více hlíz u staré hlízy, ze kterých rostou dceřinné rostliny. Krom opylení šálivých květů a vývoje semen byla u rodu *Dactylorhiza* pozorována i apomixie. (Bullini et al. 2001) Při kombinaci těchto strategií

dochází k vývoji tobolek až u 80% květů. Samoopylení je vzhledem ke stavbě spoupku nepravděpodobnou událostí. (Procházka and Velíšek 1983)

1.2.4. Mykorhiza

Předpokládaný podíl endomykotrofie na výživě vzrostlých jedinců rodu *Dactylorhiza* je ve srovnání s příbuznými taxony relativně nízký a liší se napříč druhy. Například u zmíněného druhu *D. majalis* je velmi nízký, u *D. sambucina* je však poměrně vysoký. Semena klíčí jak při výsevech k mateřským rostlinám tak i v substrátu neinfikovaném mykobiontem. Houbová vlákna lze u zástupců rodu *Dactylorhiza* nalézt v adventivních kořenech a v prstovitých výběžcích hlíz. (Procházka and Velíšek 1983)

1.3. Ekologie a rozšíření

Během periodického šíření ledovců hygryfytní předkové rodu značně rozšířili svůj areál a s posledním oteplením osídlili území s podmínkami podobnými vysokohorským. Ve xerothermních maximech interglaciálů ovšem docházelo ke smršťování areálů a extinkcím, což vysvětluje nespojitý areál mnoha druhů prstnatic v recentu. (L. V. Averyanov 1990)

Většina druhů rodu *Dactylorhiza* je hygryfylních. Jejich výskyt je zaznamenáván nejčastěji na lokalitách s alespoň sezónně vysoko položenou hladinou spodní vody, slatinách, horských vrchovištích, bažinatých loukách a pastvinách. Přesto jsou druhy, které se vyskytují i na sušších stanovištích (*D. sambucina* agg.). Vyžadují humózní, alkalický až slabě kyselý substrát. Konkrétní preference podmínek jsou pro každý druh individuální, stejně jako výskyt v různých nadmořských výškách a různě osluněných místech. Například *D. majalis* má ekologickou amplitudu velmi širokou co do pH substrátu tak i nadmořské výšky lokalit, s čímž souvisí i jeho rozšíření, jež je v rámci rodu největší, je však citlivý na zástín a nesnáší konkurenci. (Procházka and Velíšek 1983)

Rozšíření Rodu *Dactylorhiza* je převážně euroasijské, s přesahem do severní Afriky či na Aljašku. Vyskytuje se v temperátních, boreálních a na severu až subarktických územích. Areál se rozprostírá přes Skandinávii, Pobaltí a Britské ostrovy, ostrovy Madeira a Island, severní Afriku (pohoří Atlas), Malou Asii, a táhne se až na východ na Sibiř, přes Himaláje a do Japonska. Z východní Asie přesahuje do severní Ameriky na Aljašku, kde je rod zastoupen pouze druhem *D. maculata*. Nejvyšší diverzitu i míru endemismu *Dactylorhiz* můžeme nalézt v mediteránu a na Kavkaze. (Baumann, Künkele, and Lorenz 2009; Delforge 2006; Procházka and Velíšek 1983; Pillon et al. 2006)

1.4. Ohrožení a ochrana

V České republice jsou téměř všechny druhy prstnatic chráněné označením C1 (kriticky ohrožené) a úmluvou CITES. Nižší stupeň ohrožení přísluší druhům *D. sambucina* (C2), *D. fuchsii* subsp. *sudetica* (C2), *D. majalis* subsp. *majalis* (C3) a *D. fuchsii* subsp. *fuchsii* (C4). Za vyhynulý druh (označení A1) je u nás považován *D. curvifolia*. (Chobot and Grulich 2017)

Počet prstnatic se v přírodě v souvislosti s lidskou činností snižuje na úrovni jedinců i populací. Moderní přístup k managementu stanovišť, na kterých se zástupci rodu *Dactylorhiza* vyskytují je velmi necitlivý k tamním společenstvím organismů a často vede k zániku stanoviště či narušení rovnováhy v lokálním ekosystému. Prstnatce jsou na změny ve svém prostředí velmi náchylné. Jejich areály tak podléhají fragmentaci v důsledku masivního zániku stanovišť. (Delforge 2006)

Převážně hygrophilní rod *Dactylorhiza* obydluje podmáčené biotopy, které jsou značně ohrožené lidskou činností. Dochází k poklesu hladiny spodních vod a snižuje se vydatnost pramenů v důsledku odvodňování za průmyslovým a zemědělským účelem a odčerpávání vody do studní. Slatinné biotopy se nedostatkem vody nadměrně mineralizují. Dále jsou stanoviště prstnatic vystavena vysoké eutrofizaci, kvůli splachu vody z hnojených polí a luk a disturbanci těžkou mechanizací. Nevhodný management spočívá také v nevyhovujícím režimu seče či pastvy. Tyto biotopy většinou vyžadují sečení v pozdním létě a dohled nad náletovými dřevinami, aby bylo zabráněno šíření lesa či kompetičně zdatných druhů bylin. Často však trpí například nepřiměřeně intenzivní pastvou a disturbancí dobyt看. (Chytrý et al. 2010; Delforge 2006; Procházka and Velíšek 1983)

1.5. *Dactylorhiza maculata* agg.

Zástupci této skupiny mají štíhlý stonek bez dutiny, nebo jen s nepatrnou dutinou. Listy jsou tmavozelené, obvykle na svrchní straně skvrnité a soustředěné do dolní třetiny stonku. Skupina má euro-sibiřské rozšíření a dělí se do dvou podskupin. Podskupina *D. fuchsii* ($2n=40$) s cca 6 druhy, vyskytující se na alkalických substrátech a autotetraploidní podskupina *D. maculata* ($2n=80$) o cca 10 druzích s výskytem na kyselých substrátech, pravděpodobně odvozena od *D. fuchsii*. Obě skupiny jsou si velmi podobné. *D. fuchsii* se liší od *D. maculata* širšími až vejčitými listy, pyskem hluboce děleným na tři laloky či podlouhlými skvrnami (pokud jsou přítomné) orientovanými kolmo k ose listu. (Delforge 2006; Procházka and Velíšek 1983) *D. maculata* agg. je geneticky heterogenní: obsahuje skupinu diploidů (*D. fuchsii*, *D. saccifera*) a tetraploidů (*D. maculata*). Dufrêne (Dufrêne et al. 1991) k těmto třem nově zařadil i *D. caramulensis*. Jejich morfologické a ekologické rozdíly nejsou geograficky

konstantní.(Hedrén 2001) Například na Britských Ostrovech jsou *D. maculata* a *D. fuchsii* dobře rozlišitelné na základě morfologických znaků i preference prostředí výskytu. *D. fuchsii* roste na alkalických až neutrálních půdách od suché travnaté plochy až po bažinatá stanoviště, světlé lesy, zatímco *D. maculata* preferuje kyselá vřesoviště či slatiny, podmáčené louky. Na kontinentu (Německo, Rakousko, Francie) jsou těžko rozlišitelné, či determinované na jiných habitatech. (Pillon et al. 2007; Dufrêne et al. 1991)

1.6. *Dactylorhiza incarnata* agg.

Zcela hygrofilní uskupení druhů a poddruhů. Zástupci mají zploštělé, hluboce dělené hlízy, které mají na nejzamokřenějších stanovištích značně protažené úkrojky. Stonek s dutinou o průměru větším, než polovina průměru stonku bývá kolem 60 cm vysoký a statný. Listy jsou spolehlivým determinačním znakem skupiny. Svírají se stonkem velmi malý úhel, jsou světle zelené, neskvrnité či s rozpitými nevýraznými skvrnami a dlouze kopinaté, s kápovitě zakončenou špičkou. Pysk je stejně dlouhý jako široký či delší, kosočtverečného tvaru a poměrně malý. Jedná se o Eurosibiřskou skupinu obsahující kolem 8 druhů jež jsou relativně morfologicky variabilní, avšak geneticky homogenní, s karyotypem $2n=40$ (jen u *D. armeniaca* $2n=80$). (Delforge 2006; Procházka and Velíšek 1983; Hedrén 1995; Pillon et al. 2007)

2. Mikroevoluční mechanismy

2.1. Hybridizace

Hybridizaci člověk po tisíciletí využívá pro šlechtění zvířat a rostlin většinou za účelem zemědělského využití vzniklých forem organismů (Stebbins 1959; Ananthawat-Jónsson 2001; Arnold 1997) Zde se zabýváme hybridizací přirozenou, dějem, jež je součástí přirozených vztahů organismů ve volné přírodě.

Dle Arnolda (1997) může být přirozená hybridizace obecně popsána jako úspěšné spojení mezi jedinci různých populací či skupin populací, které jsou odlišitelné na základě jednoho či více dědičných znaků. Tato definice děje nekoliduje s žádným konceptem chápání druhu (mnohdy založených na reprodukční bariéře) a neomezuje svou působnost na žádnou konkrétní taxonomickou úroveň. Hybridizace hraje důležitou roli v evoluci mnoha taxonomických skupinách rostlin, ale schopnost hybridizovat či utvářet hybridogenní populace je u každého taxonu různá (Whitney et al. 2010).

2.1.1. Mezidruhov hybridizace

Pojem druh je velmi problematick definovat a v historii i dnes se objevuje více variant jeho koncepce, jež se neustále vyvíjejí, reagují na sebe a jsou předmětem vasnvch debat. Jejich shrnutm se (mimo jiné) zabývá např. King (1993) a prehledn shrnut vývoje konceptu druhu lze nalézt třeba v publikaci od De Queiroze (1998). Nkter koncepty druhu chápou hybridizaci za jev narušující druhovou integritu a postrádající jakoukoliv adaptivn výhodu pro potomstvo.(Arnold 1997) Podobn chápe hybridizaci i Stebbins (1959), jež ji charakterizuje jednoduše jako kren jedinců oddlench populací a odlišných adaptací. Konstruktivnj, než diskutovat o validit pojetí druhu je zvit význam prrozen hybridizace pro evolun pochody, napklad v na zjmov skupině *Dactylorhiza*. (Arnold 1997)

2.1.2. Výskyt hybridizace

U zvrecch i rostlinných taxonů se hybridizace podepsala na jejich dnešních formách, kter vykazují v rzn mre vliv kren a introgrese.(Arnold 1997; Whitney et al. 2010) Frekvence hybridizace je rzn napi taxony, jejichž urovnmi i strm. Hybridizaci lze dnes v prrod pozorovat u 25 % rostlinných druhů a 10 % živočišných druhů. Většinou se jedná o relativně mlad druhy, ale nedostatečnou reprodukční bariérou se vyznačují i některé před miliony let formovan druhy. (Mallet 2005)

2.1.3. Mechanismy hybridizace

Organismy ovšem disponují mechanismy, které mají neadouc hybridizaci zabrnit. Mohou jimi být prezygoticke či postzygoticke bariéry a jejich kombinace (Briggs and Walters 2001), jež musejí zvrata i rostliny prekonat, má-li dojít ke kren. Me se jednat napklad o kompetici mezi gametami. Pokud jsou prtomny mikrogamety více druhů, dochází častěji ke splynutí gamet stejného druhu, než jiného. Proti splývání gamet různých druhů funguje systém reakcí zvaných self-inkompatibilita. Na bunn urovn se jedná o podobn mechanismus, jako hetero-inkompatibilita, kter zabrauje spojen gamet stejného typu (např. dvě spermie). (Arnold 1997)

Vznik hybridů podléhá v základě dvěma faktorům: selekci, kter působí na vznikl hybridy a disperzi rodičovských jedinců do kontaktn (hybridní) zóny. Situaci popisuje tzv.: model Tensn zóny, podle něhož je hybridní zóna udržována prv vyvenm poměrem těchto dvou vlivů.(Arnold 1997) Překážky potencionln hybridní události jsou kladeny vnějšími podmínkami psted (např. geografie, podnebn podmínky) a vnitřními faktory (seznn, denn, morfologicke, ekologicke, atd. rozrznn aktérů) včetně postzygotických

reprodukčních bariér.(Briggs and Walters 2001; Levin 1978) Avšak samotné sklony k hybridizaci jsou pravděpodobně více určeny zmíněnými vnitřními vlastnostmi taxonu, než prostředím. (Whitney et al. 2010)

2.1.4. Hybridogenní linie

K ustálení vzniklého hybrida v populaci však dochází jen zřídka. Přírozená hybridizace je již ze své podstaty dějem příležitostným a obecně vzácným a vzniklí hybridi většinou nenesou žádné adaptace, jež by je zvýhodnily v populaci rodičovských druhů. Nesou-li však znak, který je v prostředí zvýhodní oproti rodičům, může z nich povstat izolovaná linie.(Arnold 1997; Stebbins 1959; Briggs and Walters 2001) Reprodukční úspěšnost různých genotypů hybridů je považována za nezávislou na prostředí, a svými hodnotami se rodičovským taxonům může rovnat, či je převyšovat. Novější model popisující evoluci hybridní zóny a posléze úspěšnost nové hybridní linie porovnává četnost hybridní (F1) generace, endogenní selekci proti hybridům určitého genotypu, exogenní selekci proti jiným hybridním liniím a rodičovským druhům a míru invaze jiných hybridních linií a rodičovských druhů, ke které exogenní selekce vede.

Odvozování nových genotypů, které mohou započít nové evoluční dráhy a podílet se na retikulární evoluci skupiny je největším přínosem hybridizace.(Arnold 1997) Znalost hybridizačního chování konkrétních taxonů nám může pomoci určit a pochopit jejich evoluční trajektorii i některé znaky (např. invazivnost). (Whitney et al. 2010)

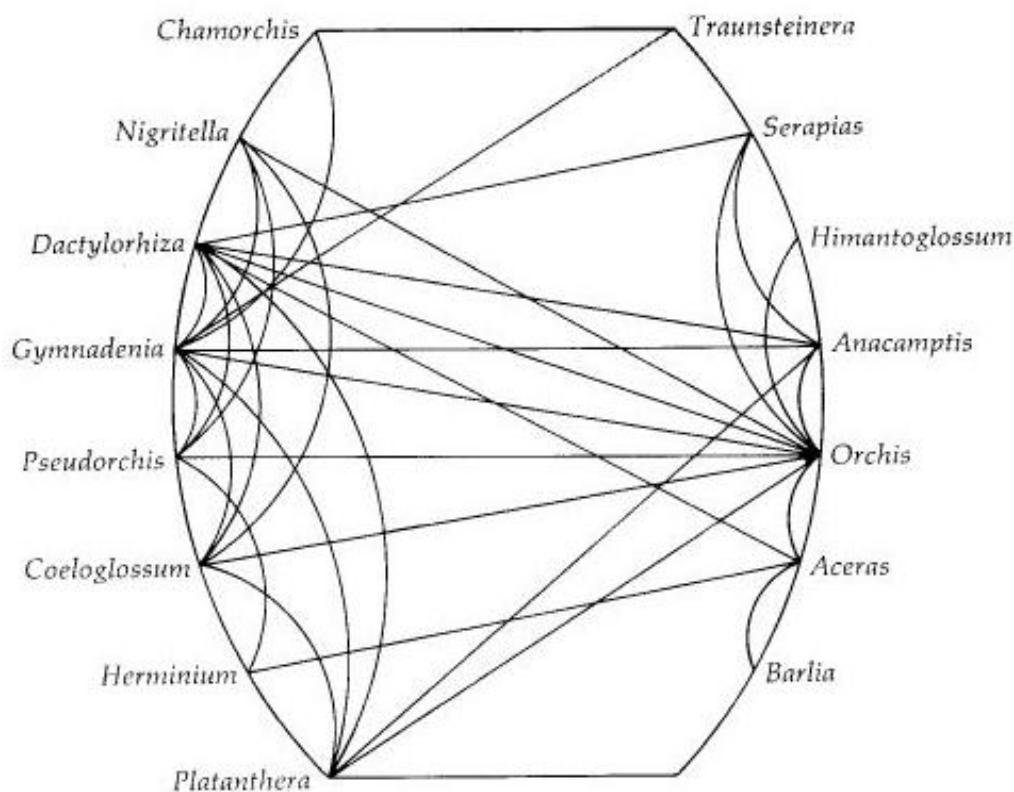
2.1.5. Dopady hybridizace

Tyto rozšířené genové invaze mezi taxony mají potenciálně důležité důsledky ve vývoji biodiverzity a speciace, biologie a fixace druhů.(Mallet 2005) V současné době je frekventované téma hybridizace původních druhů s invazními či šlechtěnými zemědělskými i geneticky modifikovanými druhy. Mohla by přinést zajímavé adaptace, ale původnímu druhu také může značně narušit integritu možným procesem introgrese a mít neprediktabilní vliv na ekosystém.(Mallet 2005; Hails and Morley 2005) Introgrese (introgresivní hybridizace) je genetická modifikace jednoho druhu hybridizací s jiným druhem a zpětným křížením s jedním z rodičovských taxonů. Ve šlechtitelství je hojně využívána. (Ananthawat-Jónsson 2001)

2.1.6. Hybridizace v subtribu Orchidinae

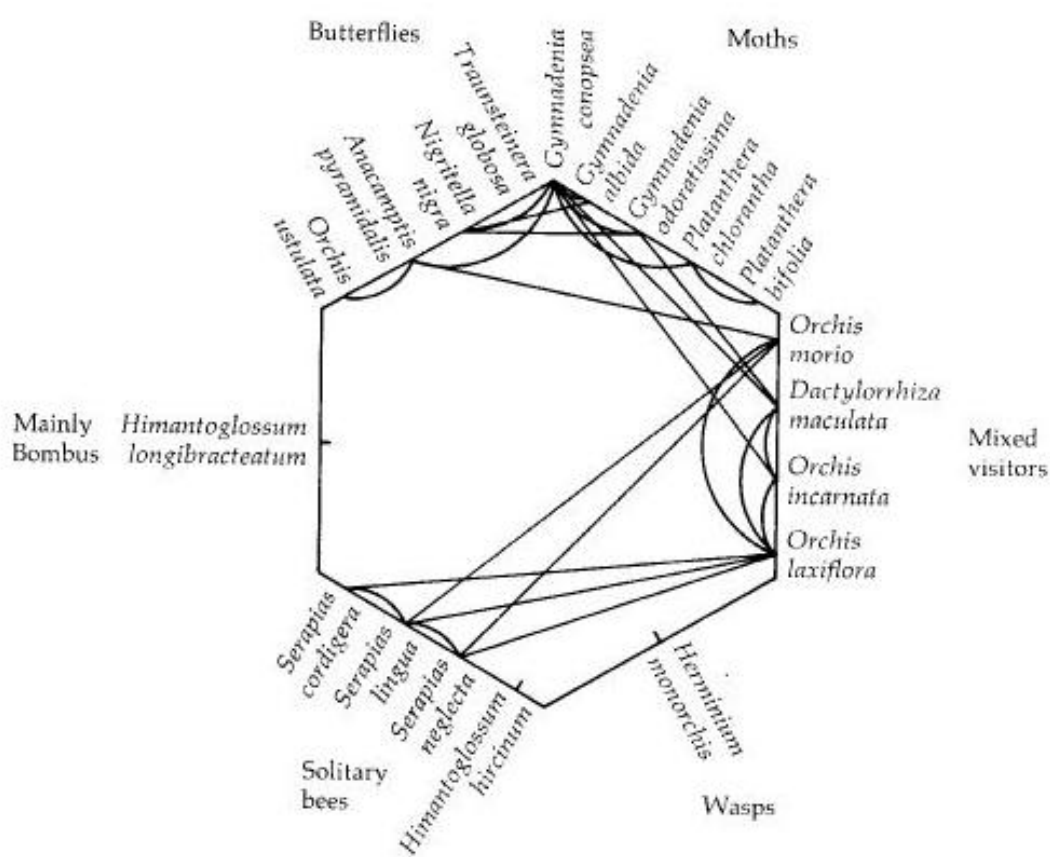
Ohledně frekvence hybridizace v subtribu Orchidinae nehovoří literatura jednoznačně. Autoři se však přibližně shodují na dvou hybridizačních skupinách: *Orchis* aliance (rody *Orchis*, *Aceras*, *Anacamptis*, *Himantoglossum*, *Serapias*) s oválným tvarem hlíz a *Dactylorhiza*

aliance (rody *Dactylorhiza*, *Coeloglossum*, *Gymnadenia*, *Nigritella*, *Platanthera*, *Pseudorchis*) s dlanitě dělenými hlízami. Hybridi mezi těmito aliancemi sice vznikají, nejsou však častí a mají nízkou plodnost. (Dressler 1981; Averyanov 1990) K hojnějšímu mezorodovému křížení s prstnatci dochází pouze s rody, jejichž hlízy jsou také dělené (*Coeloglossum*, *Gymnadenia*, *Nigritella*, *Pseudorchis*) a s nimiž jsou také dle molekulárních dat blízce příbuzní. (Baumann, Künkele, and Lorenz 2009) Pro vzniklé hybridy jsou často používána vlastní rodová jména (*Orchaceras*, *Gimnigritella* (Dressler 1981)). Nejčastěji dochází ke křížení s druhem *Gymnadenia conopsea* (15 známých forem hybridů). Křížením s dalšími druhy (*Coeloglossum viride*, *platanthera bifolia*) vzniká počet hybridů jen v řádu jednotek. Dále dochází k hybridizaci s těmi druhy rodu *Orchis*, které se s druhy rodu *Dactylorhiza* překrývají v rámci habitatu a ekologických nároků (např. *O. laxiflora*, *O. palustris*). Hybridizace s dalšími rody je nepoměrně vzácnější. Celou situaci ilustruje obrázek (obr.2.). Skupiny druhů angažované v meziorodové hybridizaci jsou ty nejběžnější: *D. maculata* agg., *D. majalis* agg., *D. incarnata* agg., které si blíže představíme a *D. sambucina* agg., (L. V. Averyanov 1990).



Obr.2.: (převzato z Dressler 1981) schéma známých meziorodových hybridů v Orchidinae vyskytujících se volně v přírodě.

V rámci subtribu Orchidinae, v němž se rod *Dactylorhiza* nachází, funguje množství opylovačů (obr.3.), dle jejichž specifity lze rody rozdělit do určitých opylovacích tříd. Lze sledovat souvislost výskytu přirozené mezirodové hybridizace se složením opylovačů, kteří navštěvují květy jednotlivých rodů. Hybridizace se často děje mezi rody stejné opylovací třídy, či mezi rody z opylovací třídy, která nemá specifického opylovače a rody z jiné třídy. (Dressler 1981) Například rod *Dactylorhiza* je navštěvován širokým spektrem opylovačů a dochází u něj k mezirodovému a hojně i mezidruhovému křížení. (Delforge 2006).



Obr.3.: (převzato z van der Pijl and Dodson 1966; Dressler 1981) Schéma hybridních vztahů mezi rody čeledi Orchidaceae ve vztahu k opylovacím třídám znázorněným na stranách šestiuhelníku.

2.1.7. Hybridizace v rodě *Dactylorhiza*

Hybridizací *D. fuchsii* a *D. incarnata* agg. nevznikají jen allotetraploidní linie (viz kapitola Allopoloidizace v rodě *Dactylorhiza*), ale i individuální diploidní kříženci na lokalitách, kde se

tyto rodičovské druhy překrývají svými areály. Tito F1 hybridy jsou však hodnoceni v naprosté většině jako sterilní. Většinově sterilní tetraploidní F1 potomky mají mít i kříženci autotetraploidní *D. maculata* a allotetraploidních linií. Nelze vyloučit, že některé tetraploidní linie klasifikované jako allotetraploidy vznikly hybridizací mezi jinými allotetraploidy. (Hedrén 1995) Nedávná studie například potvrdila hojnou hybridizaci mezi sesterskými allopolyploidy *D. traunsteineri* a *D. majalis* na územích s překryvy jejich areálů v Alpách. (Balao et al. 2016)

Mezi Allopoliploidními a rodičovskými liniemi může docházet ke zpětnému křížení (introgresi) za vzniku triploidních jedinců, kteří mají ovšem nízkou plodnost. (Hedrén 1995) Například v západní Evropě dochází k poměrně časté introgresi *D. traunsteineri* s *D. incarnata* na místech překryvu jejich areálů. (Balao et al. 2016)

Triploidy však mohou vytvářet i značně životaschopné populace. Například na jedné ze zkoumaných populací ve studii, kde podle morfologických znaků a dat z AFLP analýzy a průtokové cytometrie dochází k hybridizaci *D. incarnata* (diploidní), *D. fuchsi* (diploidní) a *D. praetermissa* (allotetraploidní) nebyl přítomen žádný jedinec klasifikovatelný jako čistá *D. praetermissa*, přičemž první dva druhy přítomny byly. (De Hert et al. 2012) Přesto zde bylo nalezeno mnoho rostlin, jež byly vyhodnoceny jako hybridy *D. fuchsi* a *D. praetermissa* či *D. incarnata* a *D. praetermissa*. *Dactylorhiza praetermissa* je totiž dobou kvetení intermediální mezi prvními dvěma jmenovanými, jejichž hybridy se, nejspíše z tohoto důvodu, na lokalitě téměř nevyskytovali. Autoři došli k závěru, že tyto triploidní hybridy pravděpodobně museli být lépe schopni se adaptovat na tamější prostředí a vykompetovali své rodiče. (De Hert et al. 2012)

Oproti tomu v jiné studii byli hybridy *D. praetermissa* a *D. incarnata* v sympatrických populacích převážně z Belgie za použití stejných metod odhaleni jen v počtu několika kusů. (De Hert et al. 2011) Zde autoři tuto situaci vysvětlují příliš lokálním přenosem pylu a rozdíly v preferencích mikrohabitatů a možnou genetickou inkompatibilitou. Někteří jedinci *D. praetermissa* však svým fenotypem mohou budit dojem, že jde o hybrida a je tedy zjevně nemoudré klasifikovat je jen podle morfologie. (De Hert et al. 2011)

2.2. Polyploidizace

Hojný výskyt polyploidních linií naznačuje, že polyploidizace jest častým a evolučním hybatelem a věda se zabývá otázkou, zda má tento fenomén sám o sobě signifikantní vliv na schéma a tempo diverzifikace. Zmnožení chromozomové sádky pravděpodobně proběhlo

v historii u všech krytosemenných rostlin (paleopolyploidie) a probíhá i v recentu. (De Bodt et al. 2005) Například na severním pobřeží Grónska (Peary Land) u tmnější arktické flóry byla polyploidie zjištěna u rekordního podílu (85,6%) flóry. (Rosenzweig 1995)

2.2.1. Polyploidizace jako speciální mechanismus

Polyploidizace je případem speciace sympatrické, protože při ní nedochází ke geografické separaci od rodičovské linie a zároveň saltační, neboť se děje skokově. (Briggs and Walters 2001; Rosenzweig 1995) Polyploidizace se totiž může projevit (skrže genovou regulaci a vliv na vývojové procesy) například na morfologii či ekologických nárocích a systému rozmnožování organismů. Polyploidní organismy mohou být díky tomu schopny obsadit novou niku, oddělenou od niky původního druhu a nekonkurovat si. (Briggs and Walters 2001)

2.2.2. Mechanismy polyploidizace

Ohledně vlivu polyploidie na generování diverzity v evoluci nejsou jednoznačné závěry a výsledky různých studií nevykazují příliš shody. (Otto and Whitton 2000) Pokud vede polyploidizace ke speciaci, může odehrávat dvěma základními cestami. Zaprvé může proběhnout autopolyploidizace, kdy zmnožená chromosomová sádka pochází od jednoho rodiče a jedinec se nazývá autopolyploid. Zadruhé, zdvojený počet chromosomů může být následek hybridizace, takže genetický materiál pochází od dvou rodičovských jedinců. Tento děj je nazýván allopolyploidizace. (Briggs and Walters 2001)

Allopolyploidizace patří u rostlin k důležitým speciálním nástrojům, ale její evoluční význam dosud není plně prozkoumán. (Balao et al. 2016; Briggs and Walters 2001) Kromě faktu, že je sama o sobě razantním zásahem do genomu ji provází řada dalších změn. Byly pozorovány chromozomové přestavby či změny genové exprese. Genová exprese může být v duplikovaném genomu nerovnoměrná, může dojít i ke kompletnímu umlčení (silencing) jedné z kopií a exprese jednotlivých kopií také může být orgánově specifická. Na tyto změny exprese při allopolyploidii má pravděpodobně větší efekt hybridní událost, než samotné zdvojení genetického materiálu. (Adams 2007)

Autopolyploidie je v přírodě obecně vzácnější. Může vzniknout splynutím neredukovaných gamet, nebo z redukovaných gamet a zmnožením genetického materiálu až poté. (Briggs and Walters 2001) Rozlišit je lze rozbořením karyotypu rodičů. Je důležitým nástrojem tvorby dalších allotetraploidních derivátů a původem velkého množství druhů. (Hedrén 1995)

Polyploidizace je ovšem změna v genomu drastických rozměrů a proto je vzhledem k její frekvenci výskytu třeba se ptát, zda na ni nejsou organismy nějakým způsobem preadaptované, aby takovou událost dovedly přežít, využít, či následně položit základ nové polyploidní linie. (Otto and Whitton 2000)

2.2.3. autopolyploidizace v rodě *Dactylorhiza*

Základní počet chromozomů u Prstnatců je $2n=40$ a byl pozorován u většiny prozkoumaných jedinců rodu. (de Soó 1980) nejmenší karyotyp mezi dnešními orchidejemi je $2n=20$ (například rod *Cypripedium*). Vzhledem k tomu a faktu, že velikost orchidejových genomů jsou většinou násobky 10 se předpokládá, že základní počet chromosomů předků orchidejí mohlo být $x=10$. (Baumann et al. 2009; Averyanov 1990) Pro rod *Dactylorhiza* a celý subtribus Orchidinae jsou typické podobné, metacentrické chromosomy s krátkými raménky.

Předpokládá se, že některé z recentních tetraploidních druhů (např. v *D. maculata* agg.) vznikly až po poslední době ledové polyploidizačními událostmi u jejich diploidních předků. (Baumann, Künkele, and Lorenz 2009; L. V. Averyanov 1990; Pillon et al. 2007)

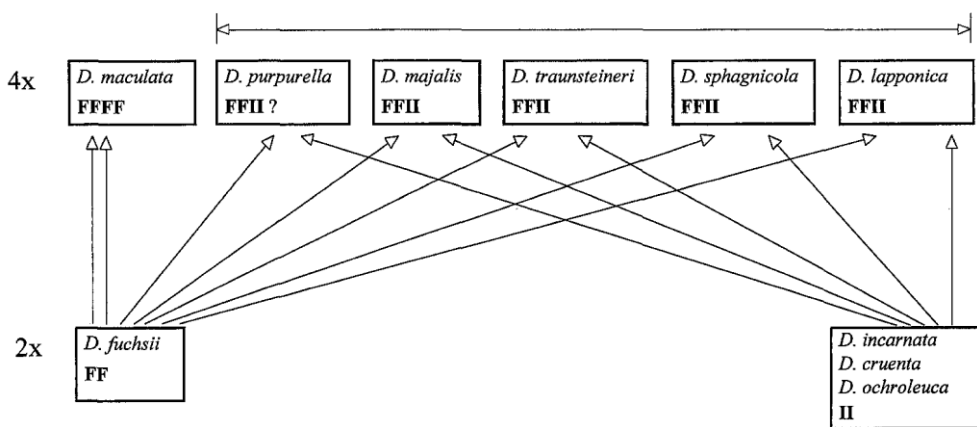
Vyhodnocení dat z plastidových a jaderných DNA markerů z velmi rozsáhlého souboru vzorků z celé Evropy odkrývá zajímavý pohled do autopolyploidie ve skupině *D. maculata* agg. (Ståhlberg and Hedrén 2010) Autotetraploid *D. maculata sensu stricto* se dělí na dvě hlavní nezávislé linie, jihozápadní a severovýchodní, s nezávislým původem. Severovýchodní linie je údajně starší, než jihozápadní a vznikla ještě před posledním glaciálem. Tyto linie se setkávají ve Skandinávii a pobaltských oblastech a utvářejí tu zřetelnou hybridní zónu se značně rozrůzněnou morfologií hybridů. Ve střední Evropě však vytváří diploidní *D. fuchsii* tvoří třetí nezávislou autotetraploidní linii, jež se od diploidní formy nedá morfologicky odlišit a datuje svůj vznik až po posledním glaciálu. (Ståhlberg and Hedrén 2010; Pillon et al. 2007)

2.2.4. Allopolyploidizace v rodě *Dactylorhiza*

Allopolyploidi mají vzhledem ke své míře heterozygosity lepší předpoklady pro přizpůsobení se novým podmínkám oproti svým rodičům a tedy ideální vlastnosti kolonizátorů. Vzhledem k většímu množství přítomných alel je mohou rozmanitě rekombinovat za vzniku nových forem proteinů. Úspěch allotetraploidních taxonů v rodě *Dactylorhiza* může souviset s nedokonalou meiozou při vzniku gamet, kdy chromosomy od různých rodičů mají problém při párování, takže budoucí generace dědí heterozygotní stav svých rodičů. (Hedrén 1995)

Otázka stáří allotetraploidních druhů není uzavřena. Studie (Hedrén 1995) uvádí, že minimální alelové rozrůznění těchto linií od rodičovských naznačuje vznik v recentní době. Odlišnosti alel allotetraploidů od rodičovských taxonů mohou být spíše známkou mutací v duplikovaném genomu či způsobené jiným geografickým původem (gen. drift při migraci či mírně odlišná rodičovská linie). Hedrén (1995) uvádí, že vznik těchto mladých, ale již značně rozšířených hybridogenních taxonů lze časově umístit do období expanze flory po posledním glaciálu, kdy se areály (před tím izolovaných) rodičovských linií geograficky setkali.

Hedrén (1995) ve své práci uveřejnil jednoduché schéma své interpretace allopolyploidní situace na základě allozymových dat (obr.4.). Vysledoval mezi allopolyploidy se shodným typem genomu také konkrétní odlišnosti v zastoupení alel, které korespondují s morfologickými definicemi linií, což by znamenalo, že alespoň některé z nich mají vzájemně nezávislou historii. Našel však na alelové úrovni i rozdíly uvnitř těchto linií (u geograficky izolovaných populací), které se dají interpretovat různě (může se jednat o linii odlišnou, nebo o potomstvo postižené genetickým driftem či bottle-neck efektem při migraci na jiné stanoviště).



Obr.4.: (převzato z Hedrén 1995) Schéma vzniku allopolyploidů.

Allopolyploidi (*D. majalis* subsp. *majalis*, *lapponica*, *traunsteineri*, *praetermissa*, *purpurella*, *alpestris*, *D. sphagnicola* a *D. elata*) vznikly pravděpodobným křížením *D. maculata* agg. (zde *D. maculata* subsp. *fuchsii*, *D. maculata* subsp. *maculata* a *D. foliosa*) a *D. incarnata* agg. (zde *incarnata* var. *Incarnata*, *ochroleuca*, *borealis* a subsp. *coccinea* a *pulchella*) byli spolu s předpokládanými rodičovskými taxony sbíranými ve Švédsku,

Britských ostrovech i jinde v Evropě podrobení metodám PCR a AFLP (polymerase chain reaction; amplified fragment length polymorphism). Výsledky této studie (Hedrén et al. 2001) rodičovské skupiny potvrdily, ale neukázaly plnou shodu. Autoři se na základě toho domnívají, že zkoumané populace allotetraploidních taxonů musejí být natolik staré, že se tyto tetraploidní taxony již od rodičů geneticky odlišily, nebo naopak vznikly z linií pouze podobných recentním zástupcům agregátů *incarnata* a *maculata*. Výsledky dále odhalily, že tyto allopolyploidní linie jsou po genomové stránce bližší agregátu *incarnata*. (Hedrén et al. 2001)

Pillon (2007) ve své studii na základě dat z plastidových haplotypů a jaderných ribozomálních ITS (internal transcribed spacer) alel určil stáří allopolyploidních taxonů a rozdělení do skupin podle rodičovských linií. Starší větev allotetraploidů vznikla před posledním glaciálem hybridizací *D. incarnata* a *D. fuchsii*. Takovým allotetraploidem je například *D. majalis*, s čímž souvisí její homogennější morfologie. Mladší větev, datovanou až po posledním glaciálu lze rozdělit do skupin podle rodičovských taxonů. První skupina vznikla hybridizací *D. incarnata* a *D. fuchsii* (popřípadě diploidní *D. saccifera*), do které se řadí například allopolyploidi *D. praetermissa*, *D. purpurella*, *D. traunsteineri* a *D. baltica*. Druhou skupinou jsou taxony vzniklé hybridizací *D. incarnata* agg. a *D. maculata*, a jedná se například o *D. occidentalis* či *D. sphagnicola*. (Pillon et al. 2007)

Navzdory zjevné fenotypové rozrůzněnosti nebyly na základě dat z mikrosatelitů zjištěny mezi evropskými zástupci *D. traunsteineri* a *D. majalis* žádné markantní rozdíly, jen slabý fylogeografický signál, což autoři připisují genomovým změnám jež jsou sice zásadní, avšak vázané na specifická místa genomu, takže je použité mikrosatelity neodhalily. (Balao et al. 2016)

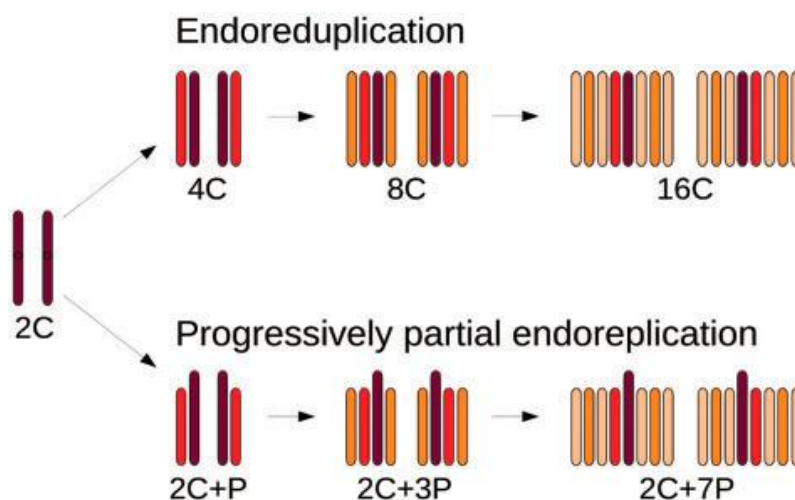
Další možné vysvětlení by bylo odlišení těchto taxonů na úrovni dědičných epigenetických změn. (Paun et al. 2010b) Paun v několika publikacích prezentoval své výsledky z výzkumu epigenetiky na allopolyploidech. Pomocí metody MSAP (methyl-sensitive amplification Polymorphism) zjistil, že allopolyploidní kříženci vykazují vyšší rozsah epigenetických úprav (a následné genové exprese) než rodičovské taxony, s čímž pravděpodobně souvisí jejich enormní plasticita. Předpokládá, že epigenetická variabilita vyvolaná údajně zdvojením genomu se vyvinula v liniově specifické formy, které reflektují allopolyploidův opakovaný vznik, jeho historii a mají vliv na jeho morfologii a reflektuje ekologické nároky. Údajně dokonce koreluje forma metylace u nezávisle vzniklých linií s jejich fenotypovým projevem. (Paun et al. 2010a, 2010b, 2011)

Křížení mezi *D. incarnata* a *D. maculata* agregáty s následným zdvojením chromozomové sádky se neodehrává jen za účasti *Dactylorhiza incarnata*, *fuchsi* či *maculata sensu stricto*. Na základě allozymových dat ze vzorků rostlin na území Turecka (Hedrén 2001) lze kupříkladu soudit, že tamější druh *D. nieschalkiorum* (4n) je nejspíše potomkem diploidních *D. incarnata* a *D. saccifera*, což je člen *D. maculata* agg, nebo že *D. urvilleana* (4n) je pravděpodobně následek křížení předků *D. euxina* (2n) z *incarnata* agregátu a *D. saccifera*. (Hedrén et al. 2011)

Odlišit a klasifikovat allotetraploidy podobného původu je obecně náročný úkol. Často jsou morfologicky či ekologicky rozrůzněni a různé formy se liší taktéž geograficky, avšak na genetické úrovni je obtížné je uspokojivě rozdělit do taxonomických skupin. Mnoho z nich proto nelze nazývat druhem a raději je autor vede v patrnosti jako poddruhy či variety druhu *D. majalis*. Takzvaný *D. majalis sensu lato* (s.l.) komplex či agregát. Takový nový morfotyp vzniká dvěma možnými způsoby. Při prvním způsobu se oddělí parapatrická populace a projde bottleneck efektem následovaným genetickým driftem, následnou adaptací, či obojím. (Hedrén et al. 2012; Hedrén et al. 2011; Briggs and Walters 2001) Při druhém způsobu dojde k nezávislým hybridizačním událostem podobných či stejných rodičů, které dají vzniknout morfologicky podobným populacím. (Pillon et al. 2007)

2.3. Progresivní Parciální endoreduplikace

V rostlinné říši lze pozorovat také jev zvaný endoreduplikace. Jedná se o zmnožení genomu v těle rostliny, po kterém nenastává mitóza a výsledkem je jádro s více kopiemi genomu (Obr.4.). Specifickou variantou tohoto jevu, který se vyskytuje jen u orchidejí, je takzvaná progresivní parciální endoreplikace (PPE). (Hřibová et al. 2016; Trávníček et al. 2015) Jedná se o proces, kdy se replikuje pouze část genomu (Obr.4.). PPE je druhově, orgánově i tkáňově specifická a její výskyt souvisí i s ontogenetickým stadiem. Evoluční impakt tohoto fenoménu není prozkoumán, ale jedná se nepochybně o vysoce kontrolovaný proces podílející se na orgánové a tkáňové diferenciaci. (Trávníček et al. 2015; Hřibová et al. 2016) Zda se u rodu *Dactylorhiza* vyskytuje úplná endoreduplikace, nebo PPE, není známo.



Obr.4.: (převzato z Hříbová et al. 2016) Znáznornění procesů endoreduplikace a progresivní parciální endoreplikace.

5. Navrhovaná diplomová práce

Potenciální diplomová práce by mohla cílit na předpokládaný význam hybridizací v evoluci prstnatců. Je uvažováno o terénní experimentální část a poté laboratorní části.

V terénní části výzkumu by mohlo probíhat řízené opylení rostlin mezi vybranými populacemi tohoto rodu přímo na lokalitách přičemž by následně byla odebrána semena.

V laboratorní části výzkumu by se mohla semena vyšet *in vitro* na medium a vyklíčené protokormy podrobit analýze vybraných charakteristik genomu pomocí metody průtokové cytometrie. Protokormy by byly pro cytometrickou analýzu naprosto postačující a *in vitro* výsevy jsou již optimalizovány. (Vejsadová 2006; Ponert et al. 2012) Z rostlin v přirozených populacích by také bylo vhodné odebrat jednotlivé květy a podrobit je stejným cytometrickým analýzám. Naměřená data z experimentálních by poskytla zajímavé srovnání s variabilitou v rámci populací.

Prstnatce jsou ohrožené rostliny vesměs rostoucí na chráněných územích. Těchto lokalit je relativně málo a případný řešitel by musel žádat o povolení a takový výzkum by samozřejmě nesl riziko poškození pokusných rostlin či znehodnocení semen vlivem faktorů prostředí či amatérských nadšenců.

Co se týče zkoumání morfologické variability druhů prstnatců, je morfometrický výzkum umělých hybridů z důvodu dlouhého vývoje rostlin a velkého množství relevantních znaků mimo časové možnosti diplomové práce.

6. Závěr

Rod *Dactylorhiza* je taxonem bez jasného počtu druhů a je velmi divergovaný na úrovni genotypu i fenotypu. Prstnatce jsou nade vše pochybnost v intenzivním vývoji a na jejich evoluci se podílejí mikroevoluční mechanismy jimiž jsou hybridizační a polyploidizační události.

Hybridizace včetně introgrese je v rodě *Dactylorhiza* častým jevem a to i mezi ploidními úrovněmi. Reprodukční bariery mezi druhy jsou relativně slabé, značná část vznikajících hybridů je fertilních a velká část linií má hybridogenní původ. Hybridogenní linie s největší pravděpodobností vznikají i v recentní době. Polyploidizace je také původem většího množství linií. Značná část genového toku souvisí s allopolyploidními liniemi v *incarnata/maculata* komplexu, které jsou obtížně klasifikovatelné, snadno se dále kříží a díky vysoké míře heterozygoty jsou také velmi plastické a adaptabilní.

Taxonomické závěry uvedené v literatuře jsou značně rozmanité a je třeba je posuzovat v kontextu dalších okolností. Lze například sledovat souvislost vývoje používaných metod s taxonomickým pojetím rodu v čase. Výzkum se tradičně opíral o morfologii a ploidní úroveň a spolu se zájmem o orchideje se navyšoval počet druhů. S nástupem molekulárních a cytologických metod se část odborné veřejnosti přiklonila ke skeptickému náhledu na „malé“ druhy, jež neměly v molekulárních datech oporu. Na druhou stranu jsou některé „malé“ druhy relativně dobře odlišitelné a někdy vymezené i ekologickými nároky. Existují dokonce práce naznačující, že se takové taxony mohou odlišovat jinými molekulárními markery, nebo dokonce epigenetickou informací. Zatím tedy nelze s jistotou uzavřít, které taxony má smysl klasifikovat na úrovni druhu a které nikoliv.

7. Použitá literatura

(Sekundární citace)*

- Adams, K. L. 2007. "Evolution of Duplicate Gene Expression in Polyploid and Hybrid Plants." *Journal of Heredity* 98 (2): 136–41.
- Anamthawat-Jónsson, Kesara. 2001. "Molecular Cytogenetics of Introgressive Hybridization in Plants." In *Chromosome Painting*, 139–148. Springer.
http://link.springer.com/10.1007/978-94-010-0330-8_14.
- Arnold, M. L. 1997. *Natural Hybridization and Evolution*. Oxford Series in Ecology and Evolution. New York: Oxford University Press.
- Averyanov, L. 1983. "The Genus *Dactylorhiza* (Orchidaceae) in the USSR. I. (Citováno Dle Averyanov 1990)."
- Averyanov, L. V. 1990. "A Review of the Genus *Dactylorhiza*." In *Orchid Biology Reviews and Perspectives*, 161–204. 5. Hong Kong: Timber Press.
- Balao, F., M. Tannhäuser, M. T. Lorenzo, M. Hedrén, and O. Paun. 2016. "Genetic Differentiation and Admixture between Sibling Allopolyploids in the *Dactylorhiza* Majalis Complex." *Heredity* 116 (4): 351.
- Bateman, R. M., and I. Denholm. 2003. "Bateman and Denholm 2003.Pdf." *Journal Europäischer Orchideen* 35 (1): 3–36.
- Bateman, R. M., P. M. Hollingsworth, J. Preston, L. Yi-Bo, A. M. Pridgeon, and M. W. Chase. 2003. "Molecular Phylogenetics and Evolution of Orchidinae and Selected Habenariinae (Orchidaceae)." *Botanical Journal of the Linnean Society* 142 (1): 1–40.
- Baumann, H., S. Künkele, and R. Lorenz. 2009. *Orchideje Evropy a Přilehlých Oblastí*. Praha: Academia.
- Briggs, D., and S. M. Walters. 2001. *Proměnlivost a Evoluce Rostlin*. 3rd ed. Univerzita Palackého v Olomouci.
- Bullini, L., R. Cianchi, P. Arduino, L. Bonis, M. C. Mosco, A. Verardi, D. Porretta, B. Corrias, and W. Rossi. 2001. "Molecular Evidence for Allopolyploid Speciation and a Single Origin of the Western Mediterranean Orchid *Dactylorhiza Insularis* (Orchidaceae)." *Biological Journal of the Linnean Society* 72 (2): 193–201.
<https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.2001.tb01311.x>.

- Chobot, K., and V. Grulich. 2017. *Červený Seznam Ohrožených Druhů České Republiky. Cévnaté Rostliny*. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR.
- Chytrý, M., T. Kučera, M. Kočí, V. Grulich, and P. Lustyk. 2010. *Katalog Biotopů České Republiky*. 2nd ed. Praha: Agentura ochrany přírody a krajiny ČR.
- Darwin, Ch. 1892. "The Different Forms of Flowers on Plants of the Same Species." John Murray, Albemarle Street.
- De Bodt, S., S. Maere, and Y. Vandepeer. 2005. "Genome Duplication and the Origin of Angiosperms." *Trends in Ecology & Evolution* 20 (11): 591–97.
- De Hert, K., H. Jacquemyn, S. Van Glabeke, I. Roldan-Ruiz, K. Vandepitte, L. Leus, and O. Honnay. 2011. "Patterns of Hybridization between Diploid and Derived Allotetraploid Species of *Dactylorhiza* (Orchidaceae) Co-Occurring in Belgium." *American Journal of Botany* 98 (6): 946–55.
- De Hert, K., H. Jacquemyn, S. Van Glabeke, I. Roldán-Ruiz, K. Vandepitte, L. Leus, and O. Honnay. 2012. "Reproductive Isolation and Hybridization in Sympatric Populations of Three *Dactylorhiza* Species (Orchidaceae) with Different Ploidy Levels." *Annals of Botany* 109 (4): 709–20.
- De Queiroz, Kevin. 1998. "The General Lineage Concept of Species, Species Criteria, and the Process of Speciation."
- Delforge, P. 2006. *Orchids of Europe, North Africa and the Middle East*. 3rd ed. London: A&c Black Publishers.
- Devos, N., O. Raspé, A. Jacquemart, and D. Tyteca. 2006. "On the Monophyly of *Dactylorhiza* Necker Ex Nevski (Orchidaceae): Is *Coeloglossum* Viride (L.) Hartman a *Dactylorhiza*?" *Botanical Journal of the Linnean Society* 152 (3): 261–69.
- Dressler, R. L. 1981. *The Orchids: Natural History and Classification*. Massachusetts: Harvard University Press.
- Dressler, R. L., and C. H. Dodson. 1960. "Classification and Phylogeny in the Orchidaceae." *Annals of the Missouri Botanical Garden* 47 (1): 25.
- Dufrêne, M., J. Gathoye, and D. Tyteca. 1991. "Biostatistical Studies on Western European *Dactylorhiza* (Orchidaceae)—the *D. Maculata* Group." *Plant Systematics and Evolution* 175 (1–2): 55–72.
- Gutowski, J. M. 1990. "Pollination of the Orchid *Dactylorhiza Fuchsii* by Longhorn Beetles in Primeval Forests of Northeastern Poland." *Biological Conservation* 51 (4): 287–97.
- Hails, Rosie S., and Kate Morley. 2005. "Genes Invading New Populations: A Risk Assessment Perspective." *Trends in Ecology & Evolution* 20 (5): 245–52.

- Hedrén, M. 1995. "Genetic Differentiation, Polyploidization and Hybridization in Northern European *Dactylorhiza* (Orchidaceae): Evidence from Allozyme Markers." *Plant Systematics and Evolution* 201: 31–55.
- Hedrén, M. 2001. "Systematics of the *Dactylorhiza* Euxina/Incarnata/Maculata Polyploid Complex (Orchidaceae) in Turkey: Evidence from Allozyme Data." *Plant Systematics and Evolution* 229 (1): 23–44.
- Hedrén, M., M. F. Fay, and M. W. Chase. 2001. "Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) Reveal Details of Polyploid Evolution in *Dactylorhiza* (Orchidaceae)." *American Journal of Botany* 88 (10): 1868–1880.
- Hedrén, M., S. Nordström, and Richard M. Bateman. 2011. "Plastid and Nuclear DNA Marker Data Support the Recognition of Four Tetraploid Marsh Orchids (*Dactylorhiza* *Majalis* Sl, Orchidaceae) in Britain and Ireland, but Require Their Recircumscription." *Biological Journal of the Linnean Society* 104 (1): 107–128.
- Hedrén, M., S. Nordström, and D. Ståhlberg. 2012. "Geographical Variation and Systematics of the Tetraploid Marsh Orchid *Dactylorhiza* *Majalis* Subsp. *Sphagnicola* (Orchidaceae) and Closely Related Taxa." *Botanical Journal of the Linnean Society* 168 (2): 174–193.
- Hříbová, E., K. Holušová, P. Trávníček, B. Petrovská, J. Ponert, H. Šimková, B. Kubátová, et al. 2016. "The Enigma of Progressively Partial Endoreplication: New Insights Provided by Flow Cytometry and Next-Generation Sequencing." *Genome Biology and Evolution* 8 (6): 1996–2005.
- Hunt, P. F., and V. S. Summerhayes. 1965. "Dactylorhiza Nevski, the Correct Generic Name of the Dactylorchids." *Watsonia* 6 (2): 128–133.
- Jersáková, J., Steven D. Johnson, and Pavel Kindlmann. 2006. "Mechanisms and Evolution of Deceptive Pollination in Orchids." *Biological Reviews* 81 (02): 219.
- King, M. 1993. *Species Evolution : The Role of Chromosome Change*. 1. paperback. Cambridge: Cambridge University Press.
- Levin, D. A. 1978. "The Origin of Isolating Mechanisms in Flowering Plants." In *Evolutionary Biology*, 185–318. Boston, MA: Springer US.
<https://doi.org/10.1007/978-1-4615-6956-5>.
- Mallet, James. 2005. "Hybridization as an Invasion of the Genome." *Trends in Ecology & Evolution* 20 (5): 229–37.

- McNeill, J, F R Barrie, W R Buck, V Demoulin, W Greuter, D L Hawksworth, P S Herendeen, and S Knapp. 2012. *International Code of Nomenclature for Algae, Fungi, and Plants (Melbourne Code)*. Koeltz Scientific Books.
- Otto, S. P., and J. Whitton. 2000. "Polyploid Incidence and Evolution." *Annual Review of Genetics* 34 (1): 401–437.
- Paun, O., R. M. Bateman, M. F. Fay, M. Hedren, L. Civeyrel, and M. W. Chase. 2010b. "Stable Epigenetic Effects Impact Adaptation in Allopolyploid Orchids (Dactylorhiza: Orchidaceae)." *Molecular Biology and Evolution* 27 (11): 2465–73.
- Paun, O., R. M. Bateman, M. F. Fay, J. A. Luna, J. Moat, M. Hedrén, and M. W. Chase. 2011. "Altered Gene Expression and Ecological Divergence in Sibling Allopolyploids of Dactylorhiza (Orchidaceae)." *BMC Evolutionary Biology* 11 (1): 113.
- Paun, O., J. A. Luna, M. F. Fay, R. M. Bateman, and M. W. Chase. 2010a. "Genomic Responses Drive Adaptation in Allotetraploid Species of Dactylorhiza (Orchidaceae; Orchidinae)." *Diversity, Phylogeny, and Evolution in the Monocotyledons*, 169–192.
- Pedersen, Æ. H. 1998. "Species Concept and Guidelines for Intraspecific Taxonomic Ranking in Dactylorhiza (Orchidaceae)." *Nordic Journal of Botany* 18 (3).
- Pillon, Y., M. F. Fay, A. B. Shipunov, and M. W. Chase. 2006. "Species Diversity versus Phylogenetic Diversity: A Practical Study in the Taxonomically Difficult Genus Dactylorhiza (Orchidaceae)." *Biological Conservation* 129 (1): 4–13.
- Pillon, Y., Michael F. Fay, Mikael Hedrén, Richard M. Bateman, Dion S. Devey, Alexey B. Shipunov, Michelle van der Bank, and Mark W. Chase. 2007. "Evolution and Temporal Diversification of Western European Polyploid Species Complexes in Dactylorhiza (Orchidaceae)." *Taxon* 56 (4): 1185–1185.
- Ponert, J., S. Vosolsobě, K. Kmecová, and H. Lipavská. 2012. "European Orchid Cultivation – from Seed to Mature Plant." *European Journal Of Environmental Ssciencs* 1 (2): 95–107.
- Procházka, F., and V. Velisek. 1983. *Orchideje Naší Přírody*. 1st ed. Praha: Academia.
- Rosenzweig, M. L. 1995. *Species Diverzity in Space and Time*. Cambridge: Cambridge University press.
- Shipunov, A. B., M. F. Fay, Y. Pillon, R. M. Bateman, and Mark W. Chase. 2004. "Dactylorhiza (Orchidaceae) in European Russia: Combined Molecular and Morphological Analysis." *American Journal of Botany* 91 (9): 1419–1426.
- Soó, R. de, ed. 1980. *Flora Europea*. 5. Cambridge: Cambridge University Press.

- Ståhlberg, D., and M. Hedrén. 2010. "Evolutionary History of the *Dactylorhiza Maculata* Polyploid Complex (Orchidaceae)." *Biological Journal of the Linnean Society* 101: 503–25.
- Stebbins, G. L. 1959. "The Role of Hybridization in Evolution." *Proceedings of the American Philosophical Society* 103 (2): 231–51.
- Sundermann, H. 1980. *Europäische Und Mediterrane Orchideen. Eine Bestimmungsflora Mit Berücksichtigung Der Ökologie, (Citováno Podle Pedersen 1998)*. 3rd ed. Hildesheim: Bricke-Verlag Kurt Schmiersow.
- Trávníček, P., J. Ponert, T. Urfus, J. Jersáková, J. Vrána, E. Hřibová, J. Doležel, and J. Suda. 2015. "Challenges of Flow-Cytometric Estimation of Nuclear Genome Size in Orchids, a Plant Group with Both Whole-Genome and Progressively Partial Endoreplication: Genome Size Estimation in Orchids." *Cytometry Part A* 87 (10): 958–66.
- Vejsadová, H. 2006. "Factors Affecting Seed Germination and Seedling Growth of Terrestrial Orchids Cultured in Vitro." *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 48: 109–13.
- Whitney, Kenneth D., Jeffrey R. Ahern, Lesley G. Campbell, Loren P. Albert, and Matthew S. King. 2010. "Patterns of Hybridization in Plants." *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 12 (3): 175–82.